体外診断用医薬品

認証番号：226ADAMX00027000

＊＊2015年5月改訂（第3版）下線部：今回改訂
＊2014年7月改訂（第2版）

レナプロ L-FABP テスト TMB
ヒトL型脂肪酸結合蛋白（L-FABP）キット

使用に際してはこの添付文書をよくお読みください。また、必要なときに読めるように保管しておいてください。

■全般的な注意

1 本キットは体外診断用であるため、それ以外の目的には使用しないでください。
2 診断の際は本測定値以外に他の検査結果や臨床症状等もあわせて考慮し、総合的に判断してください。
3 本添付文書の注意事項をよく読み、記載された使用方法に従って検査を行ってください。記載された使用方法及び使用目的以外での使用における測定結果の信頼性については保証致しかねます。
4 本キットは使用前に必ず20～28℃に戻してからご使用ください。
5 誤って凍結させた試薬及び有効期間を過ぎた試薬は測定値の信頼性を保証しかねますので使用しないでください。
6 使用にあたっては本書とあわせ使用する測定機器の添付文書及び取扱説明書をよく読んでからご使用ください。

■形状・構造等（キットの構成）

［構成試薬］

No.	構成試薬名	容量・本数等	成分（含量）等
1	L-FABP 抗体固相化マイクロプレート	96 ウェル ×1	抗ヒト L-FABP マウスモノクローナル抗体〔クローン L 産生細胞株〕結合ウェル
2	前処理液	12mL×1	緩衝剤、界面活性剤ほか
3	反応緩衝液	12mL×1	緩衝剤ほか
4	酵素標識抗体	12mL×1	パーオキシダーゼ標識抗ヒト L-FABP マウスモノクローナル抗体〔クローン 2 産生細胞株〕
5	酵素基質液	12mL×1	3,3’,5,5’-テトラメチルベンジジン、過酸化水素水ほか
6	洗浄剤	50mL×1	緩衝剤、界面活性剤ほか
7	反応停止液	12mL×1	1N 硫酸
8	標準緩衝液（0ng/mL）	2.5mL×1	緩衝剤ほか
9	標準 L-FABP（400ng/mL）	0.5mL×1	リコンビナントヒト L-FABP、緩衝剤ほか

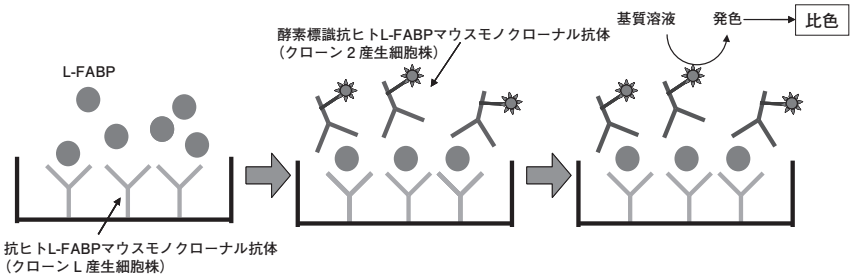
［付属品］
1 前処理用マイクロプレート　　96 ウェル ×1
2 プレートシール　　2 枚

■使用目的

尿中の L 型脂肪酸結合蛋白（L-FABP）の測定（尿細管機能障害を伴う腎疾患の診断の補助）

■測定原理

本法は酵素免疫測定法（ELISA）に基づく尿中ヒト L 型脂肪酸結合蛋白定量用キットです。
標準 L-FABP または尿検体を前処理液で処理後、反応緩衝液を分注した抗 L-FABP 抗体固相化プレートに添加し反応させます。この時、反応液中の L-FABP は固相化抗体に結合します。プレートを洗浄し、2 次抗体として酵素標識抗体を添加し反応させることにより、L-FABP の量に応じた固相抗体 - 抗原 - 酵素標識抗体から成るサンドイッチ結合物を形成します。反応後、洗浄し基質溶液を加えて酵素反応を行うと、L-FABP 抗原量に応じた発色が認められます。この吸光度をマイクロプレート用吸光光度計を用いて測定し、得られた吸光度をもとに検量線を作成し、L-FABP 濃度を求めます。



■測定試料の採取・保存法、操作上の注意

1）検体は採取後速やかに測定してください。保存する場合は、冷蔵で保存したものを 2 日以内に測定するか、または凍結（−20～−80℃）とし、検体の凍結融解の繰り返しは避けてください。また、凍結保存した検体の融解は、室温または水浴中（2～28℃）に放置して行い、測定前に十分混和してから用いてください。なお、−80℃で凍結保存した検体は 1 年間安定であることが確認されています。
2）検体は必要に応じて標準緩衝液にて希釈してください。得られた測定値が 200ng/mL を超える場合は希釈して再検査してください。
3）L-FABP 抗体固相化マイクロプレートを分割使用する場合は、未使用のプレートを乾燥剤とともに袋に入れチャックした後、テープ等で密封し 2～8℃で保存してください。
4）塩酸を添加した蓄尿は、検査値に影響を及ぼす場合があります。トルエンを用いる蓄尿の場合は、検査値への影響はありません。
5）反応時にはプレートシールをしっかり貼ってください。蒸発により反応液が濃縮され吸光度が高くなる場合があります。
6）マイクロプレートの洗浄は必ず付属の洗浄液を使用してください。不十分な洗浄は測定誤差の原因となるので正確に行ってください。
7）吸光度を測定する前にプレートの底面に汚れがないことを確認してください。反応停止後の呈色液の吸光度は低下することが確認されていますので、反応停止後速やか（30 分以内）に測定してください。
8）各反応は時間、温度等の影響を若干受けますので測定の都度、検量線を作成してください。

■妨害物質・妨害薬剤

1）検体に、高濃度のビリルビン、ヘモグロビン、グルコース、アスコルビン酸が含まれると、正確な結果が得られない場合があります。
・遊離型ビリルビン：19.7mg/dL まで測定値に影響は認められません。
・抱合型ビリルビン：21.8mg/dL まで測定値に影響は認められません。
・ヘモグロビン　　：24.4mg/dL まで測定値に影響は認められません。
・グルコース　　：45mg/mL まで測定値に影響は認められません。

・アスコルビン酸　：12.5mg/mL まで測定値に影響は認められません。
2）血管造影剤投与後 24 時間以内は一過性の腎虚血の影響により尿中 L-FABP 値が高値を示すことがありますので注意してください。

■用法・用量（操作方法）

1 準備

1）　洗浄液：洗浄剤（40 倍濃度品）全量に精製水を加えて 2000mL としたものを洗浄液とします。

2）　L-FABP 標準溶液の調製：

標準溶液の調製は標準 L-FABP（400ng/mL）を標準緩衝液（0ng/mL）で倍々希釈します。

●標準溶液の希釈方法の例

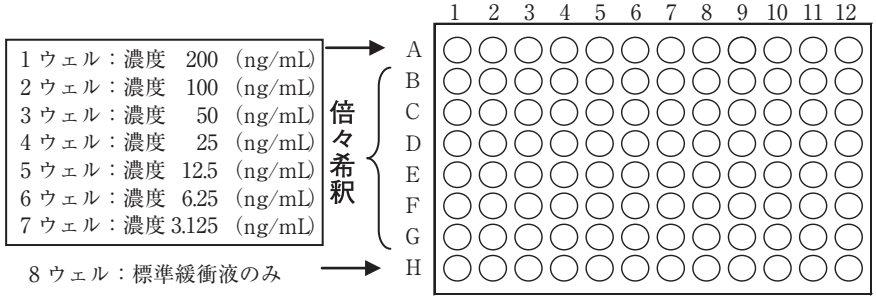
以下に標準溶液の希釈方法の一例を示します。

① 前処理用マイクロプレートの 1 列目（A1 ～ H1 ウェル）を使用します。

② 前処理用マイクロプレートの A1 ウェルから H1 ウェルに標準緩衝液（0ng/mL）を 50μL ずつ分取します。

③ A1 ウェルに標準 L-FABP（400ng/mL）を 50μL 加え混和（10 回ピペッティング）し、その溶液 50μL を B1 ウェルに加え混和します。

④ 順次 G1 ウェルまで倍々希釈を行い、G1 ウェルは溶液 50μL を取り除いてください。



前処理用マイクロプレート

2 必要な器具・器材

1）　マイクロピペット：20、50μL が分注可能なもの

2）　連続分注器：50、100μL が分注可能なもの

3）　メスシリンダー：2000mL 用

4）　プレートウォッシャーまたは洗浄ビン

5）　プレートミキサー

6）　マイクロプレート用吸光光度計：波長 450nm（副波長 610nm 以上）

3 測定操作方法

キットは使用前に 20 ～ 28℃に戻し、液状の試薬は数回静かに転倒混和し、沈殿・着色など変化のないことを確かめます。

検体の測定と同時に L-FABP 標準溶液を測定し、検量線を作成します。

1）　前処理

① L-FABP 標準溶液調製後、前処理用マイクロプレートの 2 列目から検体を 50μL ずつ各ウェルに分取します。

② 前処理液を L-FABP 標準溶液及び検体の分取されているウェルに 50μL ずつ添加します。前処理用マイクロプレートをシールし、プレートミキサーで 5 分以上攪拌します。

2）　L-FABP 抗体固相化マイクロプレートに、使用するレーン（L-FABP 標準溶液用レーン＋検体用レーン）をセットし、各ウェルに反応緩衝液を 100μL ずつ添加します。

3）　前処理用マイクロプレートから L-FABP 標準溶液を 20μL ずつ L-FABP 抗体固相化マイクロプレートに移します。

4）　前処理用マイクロプレートの検体も同様に 20μL ずつ L-FABP 抗体固相化マイクロプレートに移します。

5）　L-FABP 抗体固相化マイクロプレートをシールしプレートミキサーで 5 分間攪拌し、引き続き 20 ～ 28℃で 55 分間静置反応させます。

6）　静置反応させた後 L-FABP 抗体固相化マイクロプレートの反応液を除去します。

7）　全ウェルに洗浄液を 350μL ずつ加え、洗浄液を除去します。この洗浄操作は 3 回行いプレートの洗浄液をよく切ります。（プレートウォッシャーでも、350μL、3 回）

8）　酵素標識抗体を 100μL ずつウェルに添加します。

9）　プレートをシールしプレートミキサーで 5 分間攪拌し、引き続き 20 ～ 28℃で 25 分間静置反応させます。

10）反応終了後、反応液を除去します。7）と同様に洗浄操作を 3 回行います。

11）プレートの洗浄液をよく切り、酵素基質液を 100μL ずつ全ウェルに添加します。

12）プレートをシールし、遮光下プレートミキサーで 5 分間攪拌します。遮光下、20 ～ 28℃で 25 分静置反応させます。

13）反応停止液を 100μL ずつ全ウェルに添加し、酵素反応を停止させます。

14）プレートをたたいて反応液を混和し、30 分以内にマイクロプレート用吸光光度計を用いて各ウェルの吸光度を測定波長 450nm、副波長 610nm 以上で測定します。

15）L-FABP 標準溶液の吸光度をもとに検量線を作成し、検体中の L-FABP 量を算出します。

測定操作一覧

	検 体	標 準	ブランク
前処理	検体 50μL	L-FABP 標準溶液 50μL	標準緩衝液（0ng/mL） 50μL
	前処理液 50μL		
プレートシールをして 5 分間以上反応（プレートミキサー）			
反応緩衝液	100μL	100μL	100μL
処理検体	20μL	20μL	20μL

プレートシールをしてプレートミキサー 5 分撹拌			
20 ～ 28℃で 55 分間反応（静置）			
洗浄 3 回			
酵素標識抗体	100 μL	100 μL	100 μL
プレートシールをしてプレートミキサー 5 分撹拌			
20 ～ 28℃で 25 分間反応（静置）			
洗浄 3 回			
酵素基質液	100 μL	100 μL	100 μL
プレートシールをしてプレートミキサー 5 分撹拌			
遮光下 20 ～ 28℃で 25 分間反応（静置）			
反応停止液	100 μL	100 μL	100 μL
プレートをたたいて反応液を混和し、30 分以内に 450nm（副波長 610nm 以上）における吸光度を測定			

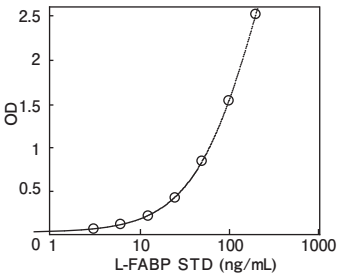
■測定結果の判定法

①各ウェルの吸光度から標準緩衝液（0ng/mL）の吸光度を差し引いて各ウェルの吸光度補正値を算出します。
②縦軸に L-FABP 標準溶液の吸光度補正値を、横軸に L-FABP 濃度をプロットして検量線を作成します。
③検体の吸光度補正値を検量線に当てはめ、検体中の L-FABP 濃度を読みとります。
④尿中クレアチニン値で補正して尿中クレアチニン 1g 当たりの L-FABP 量（μg/gCr）を算出して判定してください。

1. 参考基準範囲
健常人 412 例の尿中 L-FABP 量から算出された参考基準範囲は 8.4 μg/gCr 以下でした。
2. 判定上の注意
L-FABP 濃度で 200ng/mL を超えた検体は標準緩衝液（0ng/mL）で希釈して再測定してください。

測定値と検量線作成例

L-FABP 濃度（ng/mL）	吸光度（450nm）
200	2.497
100	1.481
50	0.842
25	0.423
12.5	0.226
6.25	0.122
3.125	0.072
0（ブランク）	0.019



●上記検量線は作成例です。自動演算ソフトを使用する場合は、最も良くフィッティングする検量線を選んでください。測定に当たってはその都度検量線を作成してください。

■臨床的意義

L-FABP は、腎臓において近位尿細管に特異的に発現する分子量約 14kDa の低分子可溶性蛋白質で、生理的には腎臓の再吸収機能を担う尿細管においてエネルギー及び脂質代謝に重要な働きをしていると考えられています[1]。腎疾患進行過程に出現する蛋白尿や微小血流障害などのストレスに応答して誘導を受け、尿中に排出されます[2,13]。これまでの腎機能マーカーは腎機能障害の破綻の結果を反映するものがほとんどであったのに対し、L-FABP は腎機能障害の程度について経過観察することが可能です[3,5]。現在、透析導入原因疾患の第 1 位である糖尿病患者の生命予後は極めて不良であるといわれています。これら糖尿病患者の尿中 L-FABP を測定することにより糖尿病性腎症の早期診断及び重症化防止の指標となりうると考えられます[7]。

弊社が実施した臨床性能試験における健常人と糖尿病患者の尿中 L-FABP 値の分布は図 1 に示したとおりです。糖尿病性腎症患者では健常人に対して有意に高い L-FABP 値（μg/gCr）を示しました。また、従来から早期糖尿病性腎症の診断に使用されているⅣ型コラーゲンと L-FABP の有病正診率および無病正診率は表 1 のとおりでした。

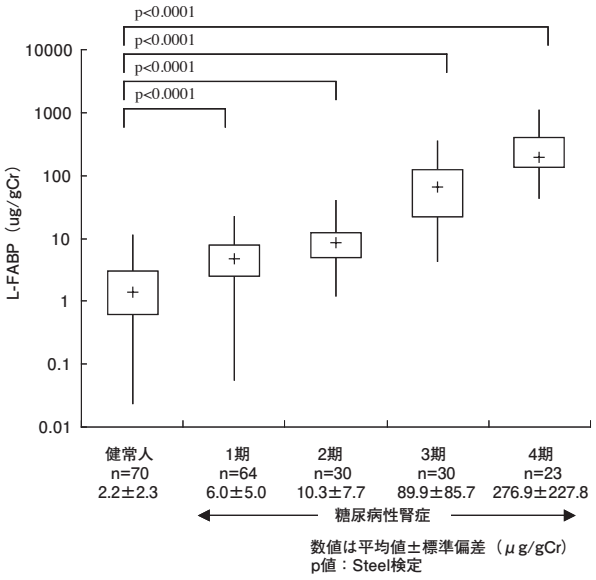


図 1　糖尿病腎症の各病期患者と健常人の尿中 L-FABP 値の分布

表 1　有病正診率と無病正診率　既存の診断法との比較

	有病正診率（糖尿病性腎症患者－病期ごと）				無病正診率
	1 期	2 期	3 期	4 期	健常人
L-FABP	21.9%	50.0%	96.7%	100.0%	97.1%
Ⅳ型コラーゲン	9.4%	46.7%	60.0%	91.3%	95.8%

■性能

1 性能
1）感度
最小検出感度 : 1.5ng/mL
（1）添付の標準緩衝液（0ng/mL）を試料として操作した場合の吸光度は 0.1 以下である。
（2）L-FABP（200ng/mL）標準溶液を試料として操作した場合の吸光度は 1.5 以上である。
2）正確性
既知濃度の管理試料を測定するとき、既知濃度の ±20%以内にある。
3）同時再現性
同一検体を 8 回同時に測定するとき、測定値の CV 値は 15%以下である。
4）管理用物質
（1）正確性試験用管理試料
標準 L-FABP は微生物由来のヒト L-FABP 組み換え蛋白を標準物質として値付けを行って作製する。濃度既知管理試料は、

この標準 L-FABP を希釈して作製した L-FABP 標準溶液である。

(2) 同時再現性試験用管理検体

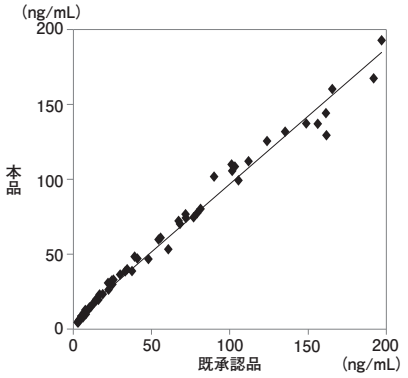
管理検体はヒト尿検体を原料とし、この原料同士を組み合わせて濃度調整を行う。

5) 測定範囲

モレキュラーデバイス社「SPECTRA Max 340PC^{384} マイクロプレートリーダー」を使用したときの測定範囲は 1.5 ～ 200ng/mL である。

2 相関性試験成績

本キットと既承認品（レナプロ L-FABP テスト）との相関性は下図のとおりでした。



回帰式：y=0.9095x+5.495
相関係数：r=0.9934
測定検体数：n=68

3 較正用の基準物質

ヒト L-FABP 遺伝子組み換え蛋白

■使用上または取扱い上の注意

1 取扱い上（危険防止）の注意

1) 検査にあたっては感染の危険を避けるため使い捨て手袋を着用し、また口によるピペッティングを行わないでください。
2) 構成試薬には動物血液成分を含む物があるので取扱いに注意し、使用後は手洗いなどを行ってください。
3) 反応停止液は強酸性（1N 硫酸）のため衣服・皮膚等への接触には十分に注意してください。
4) 試薬が誤って目や口に入った場合は、水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要があれば、医師の手当等をしてください。

2 使用上の注意

1) 使用に際しては本書に記載された使用法に従ってください。
2) 保存は 2 ～ 8℃とし、使用の前に全ての試薬は 20 ～ 28℃に戻してからご使用ください。
3) 測定結果は反応の時間や温度に影響されるので、標準及び検体ともに決められた条件下で同時に操作を行ってください。
4) ロット番号が異なる構成試薬を混ぜたり、交換して使用することは避けてください。
5) 使用期限切れの試薬は使用しないでください。

3 廃棄上の注意

1) 反応停止液は強酸性（1N 硫酸）のため廃棄には十分注意してください。
2) 反応緩衝液、標準緩衝液、標準 L-FABP は、防腐剤としてアジ化ナトリウムを含んでいます。廃棄する際には爆発性の金属性アジドが生成されないように、多量の水で希釈し流してください。
3) 試薬及び容器等を廃棄する場合は、廃棄物に関する規定に従って、医療廃棄物または産業廃棄物等区別して処理してください。
4) 検体は感染の危険性があるものとして取り扱い、使用した器具（ピペット、試験管等）、廃液、サンプリングチップ等は廃棄前に下記のいずれかの方法で処理を行ってください。
   ① 0.05%ホルマリン溶液に 37℃、72 時間以上浸す。
   ② 2%グルタルアルデヒド溶液に 1 時間以上浸す。
   ③ 次亜塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素濃度 1000ppm）に 1 時間以上浸す。
   ④ 121℃、20 分間オートクレーブにかける。

＊■貯蔵方法・有効期間

貯蔵方法　：2 ～ 8℃保存（凍結を避けてください）
有効期間　：12 ヶ月（使用期限は外箱に記載）

■包装単位

96 テスト×1

■主要文献

1. Veerkamp JH and Maatman RG. Prog Lipid Res. 34, 17－52, 1995
2. 菅谷健, 細胞. 33, 24－27, 2001
3. 上條敦子ら, 臨床病理. 51, 219－224, 2003
4. Kamijo A et al, J Lab Clin Med. 143, 23－30, 2004
5. Kamijo A et al, Am J Pathol. 165, 1243－1255, 2004
6. Kamijo A et al, J Lab Clin Med. 145, 125－133, 2005
7. Nakamura T et al, Diabetes Care. 28, 2728－2732, 2005
8. Mayer GL and Sugaya T. Fats of Life. XX, 4－12, 2006
9. Nakamura T et al, Am J Kidney Dis. 47, 439－444, 2006
10. Kamijo－Ikemori A et al, Clin Chim Acta. 374, 1－7, 2006
11. Nakamura T et al, Diabetologia. 50, 490－492, 2007
12. Negishi K et al, Kidney Int. 72, 348－358, 2007
13. Yamamoto T et al, J Am Soc Nephrol. 18, 2894－2902, 2007
14. Portilla D et al, Kidney Int. 73, 465－472, 2008
15. Nakamura K et al, Drug Metab Pharmacokinet. 23, 271－278, 2008
16. Nakamura T et al, SHOCK. 31, 454－459, 2009
17. Noiri E et al, Am J Physiol Renal Physiol. 296, 669－679, 2009
18. Nielsen SE et al, Diabetes Care. 32, 1684－1688, 2009
19. McMahon BA and Murray PT. Kidney Int. 77, 657－659, 2010
20. Nielsen SE et al, Diabetes Care. 33, 1320－1324, 2010

＊＊■問い合せ先

シミックホールディングス株式会社 L-FABP 事業部
〒 105－0023　東京都港区芝浦 1-1-1　浜松町ビルディング
TEL：03-6779-8017

製造販売元
シミックホールディングス株式会社
東京都港区芝浦 1-1-1 浜松町ビルディング